

OVER DEN INVLOED VAN INSULINE OP
DE PERMEABILITEIT DER WEEFSELS
VOOR GLUCOSE



R. J. HAMBURGER

Groningen



Digitized by the Internet Archive
in 2026

OVER DEN INVLOED VAN INSULINE OP DE
PERMEABILITEIT DER WEEFSELS VOOR GLUCOSE

OVER DEN INVLOED VAN INSULINE OP DE PERMEABILITEIT DER WEEFSELS VOOR GLUCOSE

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR
IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT
TE GRONINGEN, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-
MAGNIFICUS DR. W. J. AALDERS, HOOGLEERAAR
IN DE FACULTEIT DER GODGELEERDHEID, TEGEN
DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEES-
KUNDE IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP
WOENSDAG 19 MAART 1930,
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR,

DOOR

RUDOLF JACOBUS HAMBURGER

ARTS

GEBOREN TE GRONINGEN

M. DE WAAL — 1930 — GRONINGEN

AAN DE
NAGEDACHTENIS VAN MIJN OUDERS

AAN MIJN ZUSTER

Het verschijnen van dit proefschrift biedt mij de gaarne aangegrepengelegenheid, U Hoogleeraren, Oud-Hoogleeraren en Lectoren der Medische en Natuur Philosophische Faculteiten der Groningsche Universiteit te danken voor het onderwijs dat ik van U heb mogen ontvangen.

Het is mij een behoefte ook op deze plaats met diepe dankbaarheid te gedenken, dat het nog mijn Vader is geweest, die mijn eerste belangstelling voor experimenteel onderzoek heeft gewekt en mijn allereerste schreden op dit gebied heeft geleid.

De wenschelijke soberheid van een voorwoord, zoowel als Uw afkeer van vele loftuizingen, Hooggeleerde POLAK DANIELS, hooggeachte promotor, zijn voor mij beletselen hier U te danken zooals ik dit gaarne zou doen, voor de groote vriendelijkheid die ik steeds, ook bij het bewerken van dit proefschrift, van U heb mogen ondervinden. De gelegenheid mij in Uw kliniek tot internist te kunnen vormen, is in de eerste plaats door Uw persoonlijkheid als mensch en als medicus, een groot voorrecht.

Zeer Geleerde BRINKMAN, U dank ik voor menigen goeden raad dien ik vroeger, zoowel als ook bij dit onderzoek, van U heb ontvangen. Uw enthousiasme doet steeds weer nieuwe gezichtspunten voor verdere experimenten opkomen.

Zeer Geleerde VAN DER ZOO DE JONG, Uw nimmer falende hulpvaardigheid en vele goede wenken van theoretischen, zoowel als practischen aard, zijn mij ook bij het bewerken van deze dissertatie van groot nut geweest. Ik ben U daarvoor zeer erkentelijk.

Tenslotte aan allen die mij op eenige wijze behulpzaam zijn geweest bij het tot stand komen van dit proefschrift, in het bijzonder aan Mej. DE BOER, mijn hartelijken dank.

INHOUD.

INLEIDING	1
HOOFDSTUK I.	
Over de normale verdeeling van glucose tusschen plasma en roode bloedlichaampjes .	4
HOOFDSTUK II.	
Insuline en weefselpermeabiliteit	21
HOOFDSTUK III.	
Eigen experimenten	39
HOOFDSTUK IV.	
Samenvatting	53

INLEIDING.

Het wezen der stofwisselingsstoornis bij diabetes is, niettegenstaande de vele pogingen, die tot verklaring hiervan zijn gedaan, nog niet bekend. Het is PALMER ¹⁾ geweest, die in 1917 het eerst de aandacht heeft gevestigd op de mogelijkheid, dat deze stoornis althans ten deele zou moeten worden toegeschreven aan een verminderde permeabiliteit der weefsels voor glucose; waarvan dan een onvoldoende verbranding het gevolg zou zijn. Hij kwam tot deze opvatting door vergelijking van het glucosegehalte der spieren bij normale- en bij door pancreasextirpatie diabetisch gemaakte honden. Daarbij nam hij waar, dat zich bij de laatstgenoemde dieren relatief minder glucose in de spieren bevond dan bij de eerstgenoemde.

In verband met zijn waarnemingen over het doorlatingsvermogen der nieren voor verschillende suikers oppert ook H. J. HAMBURGER ²⁾ de mogelijkheid, dat permeabiliteitsveranderingen der weefsels bij de diabetes een rol spelen. Hij denkt hierbij dan aan mogelijke stereochemische modificaties der „bloedsuiker” bij deze patienten, waardoor deze suiker dan meer of minder gemakkelijk in de weefsels dringt dan bij een normaal individu.

¹⁾ PALMER, Journ. of Biol. Chemistry 30, 1917.

²⁾ H. J. HAMBURGER, The Johns Hopkins Hospital Bulletins 1923.

Ook in de theorie der diabetes, zooals deze door LESSER ³⁾ is opgesteld, lijkt het waarschijnlijk, dat permeabiliteitsveranderingen een rol spelen. LESSER neemt aan, dat in de levercel glycogeen en diastatisch ferment ruimtelijk gescheiden zijn. Door adrenaline kan blijkbaar deze scheiding worden opgeheven; waarvan dan dus een verhoogde glycogenolyse het gevolg is. Men kan dan veronderstellen, dat bij diabetes van de antagonist adrenaline-insuline het adrenaline overweegt en dus op de bovenstaande wijze door verhooging der permeabiliteit, al is dit dan niet voor glucose, aanleiding geeft tot een vermeerdering van het bloed-suikergehalte.

In een den allerlaatsten tijd verschenen overzichts-artikel over de insulinerwerking, uit MACLEOD ⁴⁾ de meening, dat de door verschillende onderzoekers aangetoonde invloed van insuline op de glycogeenproductie, op de nieuwvorming van glucose, op het respiratorische quotient, enz. steeds secundair is, aan een primaire, fundamenteele insulinerwerking, die aangrijpt daar, waar ook de grondslag ligt voor de stoornis der koolhydraatstofwisseling bij diabetes. Hij meent nu, dat deze werking ten nauwste moet samenhangen met het intact zijn van de celstructuur. Zij zou dan moeten leiden aan den eenen kant tot een vermindering van het glucosegehalte in de cellen, zoodat weer nieuwe suiker uit het bloed kan worden opgenomen, aan den anderen kant tot een ophooping in de cel van een of andere hypothetische intermediaire stof der koolhydraatstofwisseling, die daar dan geoxydeerd, of misschien tot

³⁾ LESSER, Bioch. Ztschr. 102, 1920.

⁴⁾ MACLEOD, The Lancet, Vol. CC XVII, July 20, 1929.

glycogeen gevormd wordt. Deze opvatting sluit zich heel goed aan bij de hypothese van een permeabiliteitsverandering als grondslag van de insulinewerking en dus tevens als fundamenteele stoornis bij diabetes. Want het ligt omgekeerd toch voor de hand, dat, indien inderdaad aan dergelijke veranderingen voor het begrip der stofwisselingsstoornis beteekenis moet worden toegekend, het insuline de permeabiliteit moet beïnvloeden. En hiermede is dan meteen een mogelijkheid gegeven om opvattingen als de bovengenoemde nader aan het experiment te toetsen. Hiertoe een bijdrage te leveren is het doel van dit onderzoek.

HOOFDSTUK I.

OVER DE NORMALE VERDEELING VAN GLUCOSE TUSSCHEN PLASMA EN ROODE BLOEDLICHAAMPJES.

De normale verdeeling van glucose tusschen plasma en roode bloedlichaampjes is een vraagstuk van zowel practisch als theoretisch belang. Voor de kliniek is het van beteekenis om te weten, of men in een bepaald geval beter doet het totale bloedsuikergehalte te bepalen, dan wel het plasmasuikergehalte. Theoretisch zal de kennis van de normale verdeeling, en in het bijzonder ook van eventueele afwijkingen daarvan in pathologische toestanden ons misschien een beter begrip kunnen geven van stoornissen in de koolhydraatstofwisseling, al zal men daarbij rekening moeten houden met de mogelijkheid, dat bloed- en celsuiker niet hetzelfde is. Men vraagt zich af, of bij diabetes patienten de verhooging van het bloedsuiker-gehalte berust op een gelijkmatige verhooging in het totale bloed, of primair op een vermeerdering daarvan in het plasma. Indien dit eerste niet het geval blijkt te zijn, doet zich, mede in verband met de theorie over de diabetes, zooals deze door verschillende schrijvers in den laatsten tijd is ontwikkeld, de vraag voor, of bij deze lijdens een veranderde permeabiliteit der erythrocyten voor glucose bestaat. Aan een bespreking

van de litteratuur over den invloed van insuline op deze permeabiliteit moet dus voorafgaan een overzicht van de opvattingen over de normale verdeeling van de bloedsuiker in het stroomende bloed, zooals deze zich in den loop der jaren hebben ontwikkeld ¹⁾.

Gedurende geruimen tijd heeft men aangenomen, dat de roode bloedlichaampjes suikervrij zijn. De eerste, die dit experimenteel heeft trachten aan te toonen, was OTTO ⁵⁾. Hij bepaalde het glucosegehalte in het plasma en in het totale bloed en berekende hieruit het volume-percentage der erythrocyten. Het op deze wijze berekende bloedlichaampjesvolume komt goed overeen met dat, wat zich op dezelfde wijze als uit de glucose-verdeeling liet afleiden uit het fibrinegehalte van totaal bloed en serum. Daar echter bekend is dat fibrine zich niet in de erythrocyten bevindt, volgt uit de genoemde overeenstemming, dat de bloedlichaampjes vrij zijn van glucose.

Op andere wijze heeft GRYNS ⁶⁾ de permeabiliteit van deze cellen voor verschillende stoffen onderzocht. Hij ging daarbij uit van de hypothese, dat een bepaalde stof niet in de bloedlichaampjes doordringt, wanneer een isotonische oplossing van deze stof geen haemolyse veroorzaakt. Hij vond zoo o.a. voor glucose een impermeabiliteit dezer cellen.

Weer een anderen weg werd ingeslagen door HEDIN ⁷⁾. Deze vergeleek de vriespuntsdaling van het plasma, nadat aan het bloed verschillende stoffen waren toe-

1) In het volgende worden de woorden bloedsuiker en glucose door elkander gebruikt.

5) OTTO, Pflügers Arch. f. die ges. Physiol. 35, 1885.

6) GRYNS, Pflügers Arch. f. die ges. Physiol. 63, 1896.

7) HEDIN, Pflügers Arch. f. die ges. Physiol. 68, 78, 1897, 1898.

gevoegd. Indien daarbij een dezer substanties binnen-dringt in de cellen, dan zal dus de vriespuntsdaling van het plasma, des te minder moeten toenemen, naarmate er meer van deze stof in de bloedlichaampjes dringt. Door deze proeven kwam ook hij tot het resultaat, dat de erythrocyten impermeabel zijn voor glucose. Door al deze onderzoeken, die men uitvoerig beschreven vindt bij HAMBURGER,⁸⁾ leek het dan ook wel vast te staan, dat de bloedsuiker uitsluitend in het plasma voorkomt.

Het is echter RONA met zijn medewerkers (MICHAELIS, TAKAHASHI, DÖBLIN) geweest, die het eerst het standpunt heeft verdedigd, dat de bloedsuiker in het stroomende bloed verdeeld is over plasma en bloedlichaampjes. Reeds in 1909 hadden RONA en MICHAELIS⁹⁾ aangetoond, dat in erythrocyten van honden zich een rechtsdraaiende, vergistbare stof bevindt, die zij als druivensuiker meenden te moeten duiden. Zij kwamen tot dit resultaat niet op grond van berekeningen van het bloedlichaampjesvolume, maar door directe bepaling in de bloedlichaampjes, die door wasschen met zoutoplossing van hun serum waren bevrijd. Op welke wijze echter de glucose in de cellen gekomen is, kunnen zij niet zeker uitmaken. Evenmin als den vroegeren onderzoekers gelukte het hun echter in vitro bij toevoeging van glucose een permeabiliteit daarvoor aan te toonen.¹⁰⁾ Dit merkwaardige verschil in permeabiliteit in vitro en in vivo, kunnen zij niet verklaren. Ongeveer terzelfder tijd gelukte het eveneens aan HOLLINGER,¹¹⁾ om nu bij menschen glucose in de roode

8) HAMBURGER, Osmot. Druck u. Ionenlehre, Bd. I, p. 207 e.v., 1902.

9) RONA en MICHAELIS, Bioch. Ztschr. 16, 1909.

10) RONA en MICHAELIS, Bioch. Ztschr. 18, 1909.

11) HOLLINGER, Bioch. Ztschr. 17, 1909.

bloedlichaampjes aan te toonen. Tegenover deze proeven staan weer de resultaten door LYTTKENS en SANDGREN ¹²⁾ verkregen. Deze onderzoekers vinden wel, evenals RONA en MICHAELIS, in de erythrocyten, een reduceerende substantie. Deze was echter niet vergistbaar en dus geen glucose. De glucose wordt door LYTTKENS en SANDGREN bij konijnen uitsluitend in het serum aangetroffen. Hierna hebben RONA en TAKAHASHI ¹³⁾ hun proeven over dit vraagstuk weer opgenomen. Zij vingen hondenbloed op in NaFl. In het bloed, resp. plasma werd dan het reduceerend vermogen bepaald, zoowel voor als na de vergisting. Eveneens werd dan de polarisatie onderzocht. Het bleek hen nu, dat de hoeveelheid rechtsdraaiende, reduceerende stof, in totaal bloed en in plasma steeds ongeveer gelijk was. Hieruit volgt dus, dat deze stof of stoffen ook in de bloedlichaampjes voorkomen. Immers, was dit niet het geval, dan zou men in het plasma hogere waarden moeten vinden, dan in het totale bloed. De hoeveelheid van deze stof laat zich gemakkelijk berekenen, wanneer tevens het volume der bloedlichaampjes bekend is. Werd echter van te voren bloed, resp. plasma vergist, dan was daarna geen reduceerende substantie meer aantoonbaar. Wij hebben hier dus te maken met een reduceerende, rechts draaiende, vergistbare stof, die dan ook waarschijnlijk wel met druivensuiker identiek zal zijn. Op grond van deze nieuwe waarnemingen blijven dus RONA en TAKAHASHI bij de reeds vroeger door RONA (l.c. 9, 10) uitgesproken meening, dat in de erythrocyten der door hen onderzochte dieren glucose voorkomt.

¹²⁾ LYTTKENS en SANDGREN, Bioch. Ztschr. 26, 1910.

¹³⁾ RONA en TAKAHASHI, Bioch. Ztschr. 30, 1911.

Ook nog op andere wijze is door RONA en DÖBLIN¹⁴⁾ de permeabiliteit der roode bloedlichaampjes voor glucose aangetoond. Zij vingen weer op dezelfde wijze als boven genoemd bloed op en bepaalden het glucosegehalte in totaal bloed en plasma, benevens het volume der erythrocyten. Daarna wordt dan een sterk hypertonische (15 %) glucoseoplossing toegevoegd en weer het glucosegehalte in de cellen bepaald. Dit blijkt dan veel grooter te zijn geworden; waarmede dan de permeabiliteit der erythrocyten onder deze omstandigheden is aangetoond. Terecht leggen ook de schrijvers zelf den nadruk erop, dat men zeer voorzichtig moet zijn, uit het gedrag van cellen ten opzichte van een zoo sterk hypertonische oplossing conclusies te trekken over hun physiologische permeabiliteit.

LYTTKENS en SANDGREN hadden, zooals wij reeds zagen, de meening uitgesproken, dat de reduceerende substantie in de bloedlichaampjes van konijnen geen glucose is en dat de glucose bij deze dieren uitsluitend in het serum voorkomt. Dezelfde schrijvers¹⁵⁾ hebben nu ook proeven verricht over de glucoseverdeeling in menschenbloed. Zij gebruikten daarvoor meest placentaïrbloed, dat zooals eenige controleproeven leerden, gelijke waarden gaf als het bloed van volwassenen. Het reduceerend vermogen van de cellen werd gevonden door directe bepaling en het bleek dan, dat de reductie in bloedlichaampjes en serum, ongeveer gelijk is. Tot geheel andere uitkomsten komt men echter, wanneer tot vergisting van serum en erythrocyten wordt overgegaan. Men ziet dan, dat de reductie van de bloed-

¹⁴⁾ RONA en DÖBLIN, Bioch. Ztschr. 37, 1911.

¹⁵⁾ LYTTKENS en SANDGREN, Bioch. Ztschr. 37, 1911.

lichaampjes vrijwel gelijk is gebleven, terwijl die van het serum aanzienlijk is gedaald. Ook voor den mensch, komen zij dus tot de slotsom, dat de roode bloedlichaampjes vrij zijn van glucose. De reductie van het serum daarentegen moet voor een groot gedeelte — ongeveer 60 % — aan de aanwezigheid van druiven-suiker worden toegeschreven. De aan de hunne tegen-gestelde uitkomsten van RONA, MICHAELIS en later TAKAHASHI meenen zij door methodische fouten te kunnen verklaren.

Tot een gelijk resultaat als RONA komt FRANK ¹⁶⁾ voor bloedlichaampjes van menschen en honden. Ook hij vond de reductie zoowel van plasma als bloedlichaampjes, na vergisting verdwenen. HÖBER ¹⁷⁾ vond eveneens glucose in de bloedlichaampjes zoowel bij normale honden en konijnen als bij dieren, die door adrenaline injectie, of ook wel door pancreasextirpatie hyperglycaemisch waren gemaakt. Het bleek hem tevens, dat bij deze hyperglycaemische dieren het suikergehalte in plasma en bloedlichaampjes niet parallel stijgt. HÖBER komt op grond hiervan tot de meening, dat de verdeling der bloedsuiker over plasma en bloedlichaampjes niet verklaard kan worden met behulp van zuivere diffusieverhoudingen. Hij spreekt daarom de veronderstelling uit, dat de bloedlichaampjes bij deze verdeling een actieve rol spelen. Hij schrijft in dit verband: „Alle diese und ähnliche Erfahrungen sind unter der blossen Voraussetzung einer Verteilung des Zuckers im physikalischen Sinne nicht verständlich, sie legen vielmehr den Gedanken nahe, dass die Blutkörperchen sich

16) FRANK, Ztschr. f. Physiol. Chemie 70, 1910.

17) HÖBER, Bioch. Ztschr. 45, 1912.

aktiv gegenüber dem Zucker verhalten, indem Sie etwa von sich aus den Import, bezw. Export, regeln."

MASING ¹⁸⁾ onderzocht de glucoseverdeeling tusschen plasma en bloedlichaampjes na toevoeging van glucose. Ook hij vond de bloedlichaampjes van den mensch permeabel voor glucose. De cellen bevatten echter minder suiker dan het plasma. Tot analoge resultaten komt ook KOZAWA ¹⁹⁾. Evenals MASING verkreeg hij het glucosegehalte der erythrocyten door directe bepaling. Zeer uitvoerige onderzoeken over hetzelfde onderwerp werden in de jaren 1919—1920 verricht door EGE ²⁰⁾. Hij voegde aan gedefibrineerd, of met oxalaat, of met NaFl onstolbaar gemaakt bloed isosmotische glucoseoplossing toe en ging dan na, hoe deze over bloedlichaampjes en plasma is verdeeld. Het toegevoegde NaFl of kaliumoxalaat remt bovendien sterk de glycolyse, die anders uit den aard der zaak bij deze proeven tot onbetrouwbare uitkomsten zou kunnen voeren. Dat deze stoffen niet zelf de verdeeling beïnvloeden, besluit EGE uit de overeenstemming van deze experimenten met die, waarbij hij gedefibrineerd bloed gebruikte. Hierbij doet zich dan echter dadelijk de vraag voor, of de verdeeling in gedefibrineerd bloed overeenkomt met die onder normale omstandigheden. Wij zullen later zien, dat deze vraag zeker niet zonder meer bevestigend mag worden beantwoord. EGE deed zijn proeven met bloed van verschillende diersoorten. Hij komt daarbij tot de conclusie, dat de roode bloedlichaampjes van konijnen, geiten, honden

¹⁸⁾ MASING, Pflügers Arch. f. die ges. Physiol. 156, 1914.

¹⁹⁾ KOZAWA, Bioch. Ztschr. 60, 1914.

²⁰⁾ EGE, Diss. Kopenhagen 1919, Bioch. Ztschr. 111, 114, 1919.

en runderen, impermeabel zijn voor glucose. Weliswaar wijzen zijn uitkomsten met runderbloedlichaampjes er op, dat er toch wel eenige glucose in deze cellen binnendringt, maar op grond van theoretische overwegingen neigt EGE er eerder toe deze uitkomsten te verklaren door proeffouten dan een, in dit geval geringe permeabiliteit der erythrocyten aan te nemen. Hij is namelijk van meening, dat een geringe permeabiliteit van een doode membraan voor glucose een „zinloos begrip” is. Wanneer een membraan permeabel is voor een stof, dan is volgens hem in den evenwichtstoestand de concentratie van deze stof aan weerszijden volkomen onafhankelijk van de meerder of minder sterke permeabiliteit van die membraan en wordt deze alleen bepaald door de hoeveelheid van deze stof, die in beide media aanwezig kan zijn. Deze opvatting van EGE schijnt mij echter voor de levende cel niet volledig. Zooals bekend is, stelt zich aan weerszijden van een membraan een evenwicht volgens DONNAN in, waarbij de membraan een belangrijke rol speelt. Deze theorie heeft betrekking op de verdeling van electrolyten aan weerszijden van een membraan, die voor één der ionen niet permeabel is. DONNAN heeft nu aangetoond dat, daar aan beide kanten van de membraan zich in den evenwichtstoestand evenveel positieve als negatieve ladingen moeten bevinden, in dat geval ook de verdeling der wel-diffusibele ionen aan weerszijden ongelijkmatig moet zijn. Hierdoor ontstaan potentiaalverschillen en osmotische krachten. De glucose neemt, als niet-electrolyt aan het DONNAN evenwicht geen deel, maar hangt er toch wel in zooverre mee samen, dat het de osmotische verschijnselen beïnvloedt en dus secundair de verdeling der glucose mede door dit

evenwicht en dus tevens door de membraan wordt bepaald.

De bloedlichaampjes van den mensch gedragen zich volgens EGE geheel anders ten opzichte van glucose dan de erythrocyten der onderzochte dieren. Zij bevatten n.l. constant aanzienlijke hoeveelheden glucose, terwijl ook na toevoeging van glucose een duidelijke concentratie vermeerdering daarvan in de erythrocyten is aan te toonen. Deze cellen zijn dus permeabel voor glucose.

Ook BÖNNIGER ²¹⁾ komt tot analoge resultaten. In verband met op zijn werk uitgeoefende kritiek kom ik daarop nog nader terug.

Ongeveer terzelfder tijd verscheen een studie van FALTA en RICHTER-QUITTNER ²²⁾ over de verdeling der glucose in het stroomende bloed. Zij komen daarbij tot geheel andere uitkomsten dan het meerendeel der vroegere onderzoekers. Terecht gaan zij uit van de redeneering, dat al deze vroegere waarnemingen gedaan zijn bij bloedlichaampjes, die in zeer onphysiologische omstandigheden verkeerden en daarom door het experiment zelf zoodanig beschadigd kunnen zijn, dat uit hun gedrag ten opzichte van glucose onder deze omstandigheden geen zekere besluiten mogen worden getrokken met betrekking tot hun glucosegehalte in vivo. De door FALTA en RICHTER-QUITTNER gebruikte werkwijze was de volgende: Zij vingden door venepunctie verkregen bloed op in een buisje met een weinig hirudine, bepaalden hierin het volume der bloedlichaampjes met de haematokriet, en onderzochten van ditzelfde bloed

²¹⁾ BÖNNIGER, *Bioch. Ztschr.* 103, 1920.

²²⁾ FALTA en RICHTER-QUITTNER, *Bioch. Ztschr.* 100, 1920.

het door centrifugeeren gewonnen plasma. Wanneer zij nu uitgingen van de veronderstelling, dat alle glucose zich in het plasma bevindt, laat zich uit het glucosegehalte hiervan en van het totale bloed het volume der gezamenlijke bloedlichaampjes berekenen. Uit overeenkomst van de berekende waarden met de experimenteel gevondene volgt dan dus, dat de oorspronkelijke veronderstelling juist is geweest. Op deze wijze werkende vinden zij dan niet alleen bij gezonde personen alle glucose in het plasma, maar ook bij diabetes patiënten blijkt dit het geval te zijn. Ook, indien kort voor het onderzoek een koolhydraatrijke maaltijd was gegeven, kwamen zij tot dezelfde resultaten. Op grond van deze uitkomsten meenen de Weensche schrijvers dan ook, dat eveneens voor klinische doeleinden de glucosebepaling in het plasma te verkiezen is, boven die in het totale bloed. Terloops zij nog opgemerkt, dat FALTA en RICHTER-QUITTNER de bloedlichaampjes op deze wijze niet alleen impermeabel vinden voor glucose, maar tot de slotsom komen, dat ook de chloriden en de reststikstof zich uitsluitend in het plasma bevinden.

Op deze onderzoekingen is van verschillende zijden zeer veel kritiek uitgeoefend. EGE²³⁾ herhaalde de proeven van de Weensche schrijvers op dezelfde wijze als zij door hen waren uitgevoerd, maar komt daarbij tot de conclusie, dat de erythrocyten van den mensch permeabel zijn voor glucose. Dit is dus hetzelfde resultaat als hij vroeger (l. c. 20) met oxalaat-fluorid- of gedefibrineerd bloed verkregen had. HAGEDORN²⁴⁾ publiceerde eenige proeven. waarbij bloed met hirudine opgevangen

²³⁾ EGE, *Bioch. Ztschr.* 107, 1920.

²⁴⁾ HAGEDORN, *Bioch. Ztschr.* 107, 1920.

en direct gecentrifugeerd werd. Hij vond dan in de bloedlichaampjes steeds ongeveer evenveel glucose als in het plasma. Eveneens afwijzend tegenover de door FALTA en RICHTER-QUITTNER verdedigde opvattingen staat FEIGL²⁵⁾. Ook de meening, dat de bloedlichaampjes geen chloriden en geen reststikstof bevatten, wordt door GAD ANDRESEN²⁶⁾ en door E. WARBURG²⁷⁾, bestreden.

Aan den anderen kant komen BRINKMAN en VAN DAM²⁸⁾ met proeven, waarin zij besluiten tot het al of niet bestaan van permeabiliteit der erythrocyten op grond van hun volume toename in glucose-houdende Ringer oplossing, tot de meening, dat de bloedlichaampjes van den mensch toch geen glucose bevatten. Zij houden echter in tegenstelling met FALTA en RICHTER-QUITTNER niet de schadelijke werking van stollingremmende middelen voor de oorzaak der tegengestelde resultaten der meeste vroegere onderzoekers. Integendeel zijn zij juist van oordeel, dat de daarvoor gebruikte middelen als oxalaat en NaFl het allereerste begin van stolling niet geheel kunnen voorkomen en dat juist met dit begin een verhooging der permeabiliteit der erythrocyten ten nauwste samenhangt. Men vindt dus volgens hen de bloedlichaampjes ook van den mensch steeds vrij van suiker, zoolang het intreden van stolling slechts volkomen verhinderd wordt. In dit verband wil ik nog even terugkomen op het bovenaangehaalde artikel van BÖNNIGER (l. c. 21) BRINKMAN en VAN DAM²⁹⁾ wijzen erop, dat in de eerste plaats

²⁵⁾ FEIGL, *Bioch. Ztschr.* 112 1920.

²⁶⁾ GAD ANDRESEN, *Bioch. Ztschr.* 107, 1920.

²⁷⁾ WARBURG, *Bioch. Ztschr.* 107, 1920.

²⁸⁾ BRINKMAN en VAN DAM, *Arch. Int. de Physiol.* 15, 1919.

²⁹⁾ BRINKMAN en VAN DAM, *Bioch. Ztschr.* 108, 1920.

BÖNNIGER niet het begin van stolling heeft voorkomen en in de tweede plaats, dat hij werkte met een isotonische glucoseoplossing, waarin de bloedlichaampjes zich ten opzichte van de haemolyse niet physiologisch gedragen.

Naderhand is het aan VAN CREVELD en BRINKMAN ³⁰⁾ gelukt, langs meer directen weg aan te toonen, dat de roode bloedlichaampjes van den mensch niet permeabel zijn voor glucose. Echter komen FOLIN en BERGLUND ³¹⁾, werkend naar dezelfde methode als VAN CREVELD en BRINKMAN, tot juist tegengestelde resultaten. Ook zij vingden het door venepunctie verkregen bloed op in een geparaffineerd buisje en scheidden door snel centrifugeeren plasma en bloedlichaampjes. Daar zij zeer snel werkten, meenen zij op deze wijze de verhoudingen te vinden, zooals deze in het stroomende bloed voorkomen. Volgens hen zijn dan niet alleen de erythrocyten doorgankelijk voor glucose, maar zij zijn zelfs geneigd tot de opvatting, dat deze cellen meer glucose uit het plasma kunnen opnemen dan met behulp van diffusie te verklaren is en houden dus een actieve opname van de suiker uit het plasma niet voor onmogelijk. Deze opvatting komt overeen met de reeds voor jaren door HÖBER (l.c.17) onderstelde mogelijkheid. Wij zagen dus, dat de proeven van FALTA en RICHTER—QUITTNER door het meerendeel der onderzoekers, niet wat de resultaten betreft, en door niemand, wat betreft hun interpretatie zijn bevestigd. Eenige jaren later hebben HÖGLER en ÜBERRACK ³²⁾ in een publicatie uit de kliniek van FALTA, op diens gezag het artikel van

³⁰⁾ VAN CREVELD en BRINKMAN, *Bioch. Ztschr.* 119, 1921.

³¹⁾ FOLIN en BERGLUND, *Journ. of Biol. Chem.* Vol. 51, 1922.

³²⁾ HÖGLER en ÜBERRACK, *Bioch. Ztschr.* 148, 1924.

FALTA en RICHTER—QUITTNER, dat zooveel stof heeft doen opwaaien, teruggenomen. De destijds gevonden impermeabiliteit der erythrocyten voor glucose zou berusten op een foutieve uitvoering der methode van onderzoek.

M. B. WISHART ³³⁾ vindt de bloedlichaampjes van honden, geiten en schapen permeabel voor glucose en in het algemeen het suikergehalte van de erythrocyten iets lager dan van het plasma.

PARNAS en JASINSKY ³⁴⁾ vangen door venepunctie verkregen bloed op in een geparaffineerd buisje en scheiden direct plasma en bloedlichaampjes. Zij nemen dan wat plasma af voor de glucosebepaling en centrifugeeren de rest nog gedurende ongeveer 5 minuten. Daarna nemen zij uit het midden van de bloedlichaampjeskolom een proefje voor de bepaling der glucose. Zij zagen gemiddeld eerst 15 minuten daarna stolling optreden. Bovendien zou deze stolling beginnen op de scheidingsplaats van plasma en bloedlichaampjes, waar de bloedplaatjes zich bevinden, en zou zij zich slechts langzaam in het erythrocytenzuiltje voortplanten. De schrijvers nemen dan ook aan, dat de erythrocyten, die zij voor hun bepalingen gebruikten, „wenig vom Gerinnungsprozeß tangiert werden”. Op grond van hun op deze wijze uitgevoerde onderzoeken komen dan PARNAS en JASINSKY tot de overtuiging, dat de roode bloedlichaampjes van den mensch, glucose bevatten. Hier-tegenover zou ik dan echter willen opmerken, dat in de eerste plaats volgens de boven aangehaalde waarnemingen van BRINKMAN en VAN DAM (l.c. 28), juist het

³³⁾ WISHART, Journ. of Biol. Chem. Vol. 44, 1920.

³⁴⁾ PARNAS en JASINSKY, Klin. Woch. Schr. 1, 1922.

allereerste begin van stolling gepaard gaat met een optreden van de permeabiliteit der erythrocyten, en dit begin van stolling is bij de proeven van PARNAS en JASINSKY, ook volgens hun eigen mededeeling, niet geheel voorkomen. In de tweede plaats bevat het bloedlichaampjeszuiltje, na slechts 5 minuten centrifugeeren, zeker nog vrij aanzienlijke, onbekende hoeveelheden plasma, zoodat men daardoor schijnbaar glucose in de bloedlichaampjes kan vinden, terwijl deze in werkelijkheid in het plasma aanwezig is. Deze proeven geven dus m.i. geen recht hieruit een conclusie te trekken over het glucosegehalte der erythrocyten. BRANN³⁵⁾ vindt eveneens een gelijkmatige verdeling van glucose over plasma en bloedlichaampjes. Aan den anderen kant komt weer CSAKI³⁶⁾, werkend op dezelfde wijze als BRINKMAN en VAN DAM, tot met de hunne overeenstemmende resultaten. Hij vindt dus de bloedlichaampjes impermeabel voor glucose. HANSEN³⁷⁾ ving eveneens het door venapunctie verkregen bloed op in een geparaffineerd buisje en scheidde zoo snel mogelijk plasma en bloedlichaampjes. Zij vindt dan bij gezonde, nuchtere personen steeds ongeveer evenveel glucose in het plasma als in de bloedlichaampjes. Tot eenzelfde resultaat komen ook PICO-ESTRADA en MORERA³⁸⁾, die voor hun proeven oxalaatbloed gebruikten. PALOMBELLA³⁹⁾ vindt ook bij den mensch geregeld aanzienlijke hoeveelheden glucose in de roode bloedlichaampjes. SHOPE⁴⁰⁾ onderzocht de glu-

35) BRANN, *Klin. Woch. Schr.* 1, 1922.

36) CSAKI, *Wien. Arch. f. Innere Med.* 3.

37) HANSEN, *Acta Med. Scand. Suppl.* IV, 1923.

38) PICO-ESTRADA en MORERA, *Cpts. rend. des séances de la soc. de Biol.* 93, 1925.

39) PALOMBELLA, *Arch. per lescienze med.* 49, 1927 (cit. *Zentralbl.* 50, 1928).

40) SHOPE, *Journ. of Biol. Chem.* 78, 1928.

cose verdeeling in oxalaatbloed en vond dan steeds, dat bij normale menschen de erythrocyten glucose bevatten. In den laatsten tijd zijn ook door SOMOGYI ⁴¹⁾ nog weer dergelijke onderzoekingen verricht. Hij is van oordeel, dat stollingwerende middelen en defibrinatie de verdeeling der bloedsuiker niet wijzigen. SOMOGYI vindt nu de verhouding tusschen de reduceerende substantie, (d. i. glucose + restreductie) in bloedlichaampjes en plasma 110 : 100, dus vrijwel een gelijke verdeeling. Bepaalt hij nu echter dezelfde verhouding alleen voor de vergistbare fractie der reduceerende stof, d. i. voor de glucose, dan vindt hij 77 : 100, dus een geringer gehalte der roode bloedlichaampjes aan glucose als door het meerendeel der onderzoekers wordt aangenomen. Hij onderzocht nu ook, hoe de verdeeling is bij diabetespatienten en hierbij bleek hem, dat inderdaad bij deze patienten relatief minder reduceerende substantie in de erythrocyten aanwezig is dan normaal. Het bleek hem echter tevens, dat alleen dit schijnbare suikergehalte wisselend is en dat de werkelijke glucose verdeeling, zooals deze na vergisting te bepalen is, ook bij diabetes dezelfde is als bij gezonde personen. Hij wijst er daarom op, dat men zeer voorzichtig moet zijn, met op dergelijke proeven soms vergaande theorieën te baseeren over de pathogenese der diabetes.

Wanneer wij nu het voorgaande samenvatten, dan zien wij dus, dat de meeste onderzoekers aannemen, dat bij dieren de bloedlichaampjes vrij zijn van glucose, maar dat dit voor den mensch nog twijfelachtig is. Het meerendeel der waarnemingen wijst erop, dat de men-

⁴¹⁾ SOMOGYI, Journ. of Biol. Chem. 78, 1928.

schen (en de apen) hier een uitzonderingspositie innemen. Bij hen zou zich normaal wel glucose in de erythrocyten bevinden. Men is echter m. i. niet gerechtigd om, zooals EGE en HANSEN ⁴²⁾ dit doen, alleen op grond van het feit, dat zij die der minderheid vormt, de opvatting, die ook voor den mensch de impermeabiliteit der bloedlichaampjes blijft aannemen, eenvoudig voor onjuist te verklaren. Temeer daar toch het vinden daarvan, minder goed door proeffouten te verklaren is, dan de uitkomsten waardoor wel glucose in de cellen wordt aangetoond.

Ook de glycolyse kan een argument vormen voor de opvatting, dat in physiologische omstandigheden, de roode bloedlichaampjes geen suiker bevatten. Het is toch bekend, dat de glycolyse een intracellulair proces is. Hieruit volgt dus, dat in bloed dat buiten het lichaam gebracht wordt en waarin dan glycolyse plaats vindt, de glucose in de erythrocyten moet zijn binnengedrongen. Omgekeerd echter, blijkt hieruit tevens, dat wanneer in bloed dat bewaard wordt buiten het lichaam, maar in een aan beide zijden afgebonden bloedvat, geen glycolyse optreedt, zooals dit door ARTHUS ⁴³⁾ is aangetoond, de erythrocyten geen glucose bevatten. Terecht wijzen BRINKMAN en VAN DAM (l. c. 28) erop, dat hierin een argument gelegen is voor de meening, dat in vivo de roode bloedlichaampjes suikervrij zijn.

Wij moeten tot de conclusie komen, dat niettegenstaande het vele werk dat hierover is verricht, het vraagstuk der normale verdeeling van de bloedsuiker over plasma en erythrocyten, nog steeds niet op bevredigende wijze is opgelost.

Ter verklaring van de verschillende uitkomsten is

⁴²⁾ EGE en HANSEN, *Acta Med. Scand.* LXV, 1927.

⁴³⁾ ARTHUS, *Arch. de Physiol.* 1891—1892.

men natuurlijk in de eerste plaats geneigd te denken, dat de verschillende methoden gebruikt om het bloed op te vangen, (oxalaatbloed, natriumfluoridbloed, paraffine methode) tot verschillende uitkomsten leiden. Merkwaardigerwijze komen echter ook zij, die met dezelfde methode werkten, soms tot geheel tegengestelde uitkomsten.

Op een andere oorzaak, die de slechte overeenstemming tusschen de uitkomsten der verschillende onderzoekers op dit gebied zou kunnen verklaren, wijzen in een kortgeleden verschenen artikel HERBERT en GROEN⁴⁴⁾. Zij toonden aan, dat de verdeeling van de suiker tusschen plasma en bloedlichaampjes, die men vindt, in hooge mate afhankelijk is van de methode der bloedsuikerbepaling, welke wordt gebruikt. In het algemeen komen deze bepalingen in het plasma, uitgevoerd naar verschillende methoden, goed met elkander overeen. Voor de bloedlichaampjes is dit echter niet het geval, zoodat men daardoor een verschillende verdeeling vindt. Er wordt echter met alle 6 gebruikte methoden, zij het nu eens meer, dan eens minder, glucose in de roode bloedlichaampjes van den mensch gevonden.

Tenslotte zou men dan nog kunnen denken aan de mogelijkheid, dat weliswaar de erythrocyten permeabel zijn voor glucose, maar dat hun gehalte daaraan wisselend is en zeer klein kan worden; zoodat het dan niet goed meer is aan te toonen. De factoren echter, waarvan dan eventueel een dergelijk wisselend gehalte afhankelijk zou kunnen zijn, zijn geheel onbekend.

⁴⁴⁾ HERBERT en GROEN, Biochem. Journ. Vol. 23, 1929.

HOOFDSTUK II.

INSULINE EN WEEFSELPERMEABILITEIT.

De eerste, die den invloed van insuline op de permeabiliteit onderzocht, was WIECHMANN ⁴⁵⁾. Hij vergeleek daartoe de verdeeling van de glucose tusschen plasma en roode bloedlichaampjes bij diabetespatienten voor en na insulinebehandeling. Hij kwam daarbij tot het resultaat, dat na insulinetoevoer deze verdeeling, die eerst verschoven was in de richting van een verhoogd glucosegehalte van het plasma, weer normaal werd. M.a.w., dat de roode bloedlichaampjes meer glucose opnemen. Wij merken dan hierbij op, dat WIECHMANN ⁴⁶⁾ onder „normaal” hier verstaat een gelijke verdeeling tusschen plasma en erythrocyten; een meening, die zooals wij in het voorgaande Hoofdstuk zagen, niet door alle onderzoekers op dit gebied gedeeld wordt. Uit dit verschil van meening volgt meteen de kritiek, die op de waarnemingen en conclusies van WIECHMANN is uit te oefenen. Waar toch de normale toestand niet met zekerheid bekend is, stuit men uit den aard der zaak op groote moeilijkheden, wanneer men afwijkingen van de norm wil aantoonen.

⁴⁵⁾ WIECHMANN, Münch. Med. Woch. Schr., 1924.

⁴⁶⁾ WIECHMANN, Ztschr. f. die Ges. Exp. Med. 41, 1924.

SYBRANDY ⁴⁷⁾ vond, dat de afvoer van glucose uit het arteriële bloed naar de spieren door insuline bevorderd wordt. Hij schrijft dit toe aan een vermeerderden glyco-geenopbouw in de spieren onder invloed van insuline, waardoor dan glucose aan het bloed wordt onttrokken.

WERTHEIMER ⁴⁸⁾ zag evenals ROSENOW ⁴⁹⁾, dat bij diabetes het verschil in glucosegehalte tusschen arteriël- en veneus bloed veel minder uitgesproken is dan normaal. WERTHEIMER kon dit ook nog op zeer overtuigende wijze aantoonen doordat hij bij honden dit verschil bepaalde voor en na pancreasextirpatie. CORI, CORI en GOLTZ ⁵⁰⁾ bepaalden het glucosegehalte in het bloed in de arteria- en de vena femoralis. Het bleek nu, dat na insuline-injectie de veneuse bloedsuiker gedaald was. FRANK, NOTHMANN en WAGNER ⁵¹⁾ vergeleken het bloedsuikergehalte in den linker ventrikel en in de vena femoralis en toonden aan, dat onder invloed van insuline het verschil zelfs grooter werd dan normaal. Tot analoge resultaten komt LAWRENCE ⁵²⁾ voor bloed uit de capillairvaten vergeleken met dat verkregen door venepunctie.

In verband met deze proeven moet genoemd worden de door WIECHMANN (l.c. 46) daarop uitgeoefende kritiek. Hij gaat daarbij uit van het reeds lang bekende feit, dat het volume der bloedlichaampjes in arteriël- en veneus bloed, niet gelijk is. Dit maakt een zuivere vergelijking tusschen het arteriële- en veneuse bloed-

47) SYBRANDY, Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1925, p. 1959.

48) WERTHEIMER, Med. Klinik, 1924.

49) ROSENOW, Klin. Wochschr. 7, 1928.

50) CORI, CORI en GOLTZ, Journ. of Pharmacol. and exp. Ther. 22, 1923.

51) FRANK, NOTHMANN u. WAGNER, Klin. Woch. Schr. 3, 1924.

52) LAWRENCE, Brit. Med. Journ. 1924, p. 516.

suikergehalte bezwaarlijk. Bovendien zou de veranderde verdeling der glucose tusschen bloedlichaampjes en plasma bij diabetes aanleiding geven tot fouten, zoodat hij in het bijzonder voor het onderzoek van diabetes-patienten tegenover normale contrôle personen het doen van bloedsuikerbepalingen onjuist acht. Hij vergelijkt daarom de arteriële en de veneuze plasma-suiker met elkaar; om te trachten een inzicht te krijgen in de permeabiliteit der weefsels voor glucose. Hij komt met deze methode tot dezelfde resultaten als de bovengenoemde onderzoekers. Overigens brengt hij op deze wijze weer de glucosepermeabiliteit der erythrocyten in het geding; wat de uitkomsten in verband met het doorlatingsvermogen van andere weefsels kan vertroebelen. Om deze reden schijnt mij dan ook in casu het onderzoek van het totale bloed te verkiezen boven dat van het plasma.

Tegenover de boven aan gehaalde onderzoekingen staat het werk van HANSEN en RØNLUND⁵³⁾. Zij maakten bloedsuikerkrommen van het arteriële bloed (d.w.z. bloed uit het oorlelletje) en van het veneuse bloed bij diabetespatienten, die van te voren een insuline-injectie hadden gehad en daarna glucose per os. Zij vonden dan het verschil tusschen beide curven vrijwel steeds onafhankelijk van het feit of er al of niet insuline werd ingespoten, terwijl, wanneer insuline inderdaad de permeabiliteit verhoogde, men bij deze patienten juist een grooter verschil tusschen het arteriële en het veneuse bloedsuikergehalte zou moeten vinden.

De meeste onderzoekers komen dus tot de slotsom, dat insuline een peripheer aangrijpingspunt moet hebben. Maar of de werking van het pancreas-hormoon nu ligt

⁵³⁾ HANSEN en RØNLUND, Acta Med. Scand. 62, 1925.

in een versterking van de glycogeenvorming, of (en) in een verhoogde verbranding van de glucose, of dat het ten slotte een permeabiliteitsverhoging van de weefsels is, die de glucose uit de circulatie doet verdwijnen, is op deze wijze niet uit te maken.

Voor al de laatste mogelijkheid is door de publicaties van LOEWI ⁵⁴⁾ en zijn medewerkers meer op den voorgrond gekomen. Overigens ook wanneer men aanneemt, dat onder invloed van insuline glucose in de roode bloedlichaampjes dringt, is het nog de vraag, of dit ook geldt voor ander weefsel, b.v. spierweefsel en ten slotte of daar dan de koolhydraatomzetting evenredig is aan de glucoseconcentratie.

CUENCA ⁵⁵⁾ toonde aan, dat de verdeeling van de glucose tusschen plasma en spierweefsel, zoowel bij dieren met sterke, als dieren met geringe insulineproductie gelijk is; wat dus pleit tegen de meening van LOEWI, WIECHMANN e.a. Aan den anderen kant vindt hij echter wel, dat intraveneus geïnjecteerde glucose bij insulinerijke dieren sneller in de spieren dringt dan bij insulinearme. Ter verklaring hiervan neemt hij echter behalve de permeabiliteitshypothese, de mogelijkheid in aanmerking, dat insuline door ontsluiting van capillairen een betere doorstrooming van het spierweefsel zou bewerkstelligen en daardoor een betere glucoseopname.

Hier moet ook genoemd worden het werk van KUROKAWA ⁵⁶⁾. Hij infundeerde bij konijnen een hypertoonische glucose-oplossing en zag dan een sterke bloed-

⁵⁴⁾ LOEWI, HÄUSLER en medewerkers, *Pflüg. Arch.* 198, 210, 213, 214, 215, 217, *Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol.* 123, 125.

⁵⁵⁾ CUENCA, *Bioch. Ztschr.* 190, 1927.

⁵⁶⁾ KUROKAWA, *Tohoku Journ. of exp. Med.* 10, 1928.

verduunning optreden, waarbij een zoo sterk verminderd glucosegehalte van het bloed ontstond, dat hij dit niet alleen door de bloedverduunning verklaren kon. Hij neemt dus aan, dat glucose in de weefsels wordt opgenomen. Een steun hiervoor ligt in de waarneming, dat intraveneuse glucose-injectie een snelle stijging van de arterieele bloedsuiker geeft en slechts een zeer langzame van de veneuze. Insuline blijkt hierop geen invloed te hebben. Verder vindt hij bij dieren met diabetes dezelfde verschijnselen in gelijke mate. Ook dit pleit dus tegen een permeabiliteitsverandering der weefsels bij diabetes. Bij doorstromingsproeven van de geïsoleerde extremiteit, kwam hij tot dezelfde resultaten.

POLLAK⁵⁷⁾ onderzocht den invloed van insuline op de resorptiesnelheid van glucose. Hij bracht daartoe een suikervrije Ringeroplossing in de buikholte van een konijn en ging na in hoeveel tijd de glucoseconcentratie in deze oplossing gelijk werd aan die in het bloed. Wanneer hij dan insuline inspoot zag hij een geringe verlangzaming van diffusie naar de buikholte. Brengt men echter een zoo sterk glucosehoudende Ringervloeistof in de buikholte, dat de diffusie in omgekeerde richting gaat, dan blijkt insuline haar te versnellen. POLLAK meent echter geen permeabiliteitsveranderingen te behoeven aan te nemen, maar zijn resultaten te kunnen verklaren, door veranderingen in het concentratieverschil, tusschen de suiker in het bloed en in de Ringeroplossing, waarvan dan gewijzigde diffusieverhoudingen het gevolg zijn, terwijl deze juist volgens de oudere onderzoekingen van HAMBURGER⁵⁸⁾, STARLING⁵⁹⁾,

57) POLLAK, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 125, 1927.

58) HAMBURGER, Osmot. Druck u. Ionen Lehre, 1902—1904.

59) STARLING, Schäfer's Textbook of Physiol., 1898.

e. a. een zoo belangrijke factor vormen voor de snelheid der resorptie. Hij kan echter een mogelijke invloed van insuline op de permeabiliteit der weefsels niet geheel uitsluiten, maar deze zou dan in het eerste geval in een vermindering daarvan moeten bestaan.

Ook waarnemingen met andere stoffen dan glucose wijzen op een verandering en wel een versnelling der resorptie door insuline. Zoo vonden DONATH en TANNE⁶⁰⁾ een verhoogde resorptiesnelheid voor fluoresceïne natrium; WIECHMANN en GATZWEILER⁶¹⁾ zagen een verminderde tolerantie voor alcohol optreden na insuline toevoer. Ook KOREF en MAUTNER⁶²⁾ vinden een versnelling van de resorptie van water, kaliumzouten en curare onder invloed van insuline. Zij vonden deze echter eerst, wanneer hypoglycaemie was opgetreden terwijl wanneer door glucosetoevoer het bloedsuikergehalte weer normaal was geworden, ook de resorptie weer even sterk was als te voren. Zij concludeeren hieruit dat niet het insuline direct een invloed op de permeabiliteit heeft, maar dat de permeabiliteits-verhooging in verband staat met de door insuline veroorzaakte veranderingen in de stofwisseling. Daarentegen zagen PETERSEN en MÜLLER⁶³⁾ een vermindering van de lymphstroom na insuline toevoer, wat door hen geduid wordt als een verminderde permeabiliteit van de endotheelcellen in het splanchnicus gebied.

Het bezwaar van al deze proeven in vivo, die er voor het meerendeel op wijzen, dat insuline invloed heeft op de verdeeling van glucose tusschen plasma

60) DONATH en TANNE, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol. 119, 1927.

61) WIECHMANN en GATZWEILER, D. Arch. f. Klin. Med. 157, 1927.

62) KOREF en MAUTNER, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol. 113, 1926.

63) PETERSEN en MÜLLER, Ztschr. f. exp. Med. 54, 1927.

en weefsels, blijft wel, dat men hierbij met zoo gecompliceerde processen te doen heeft, dat het moeilijk, zoo niet onmogelijk is om daaruit conclusies te trekken over een eventueele permeabiliteitsverandering. Deze moeilijkheid omzeilt men, wanneer men tracht onder de zooveel eenvoudiger omstandigheden van het experiment in vitro te werken. Al schept men hiermee uit den aard der zaak weer bronnen, welke tot verkeerde conclusies zullen kunnen leiden.

WIECHMANN (l.c. 45) trachtte reeds de door hem in vivo aangetoonde insulinewerking in vitro te reproduceeren; wat hem echter niet gelukte, evenmin als aan VELICOGNA ⁶⁴⁾. Ook ELISABETH MÜLLER ⁶⁵⁾ kon geen invloed van insuline op de permeabiliteit der erythrocyten voor glucose en Cl' aantoonen. De eersten aan wie dit inderdaad gelukte, waren HÄUSLER en LOEWI ⁶⁶⁾. Zij gebruikten in het algemeen de volgende methode:

Gelijke hoeveelheden met NaFl onstolbaar gemaakt bloed of weefselbrij worden in twee kolfjes gebracht en daaraan een gelijke hoeveelheid isotonisch NaCl toegevoegd; in het eene kolfje werd bovendien ook insuline toegevoegd. Nadat in beide kolfjes nog even groote hoeveelheden plasma (resp. isotonische NaCl oplossing en isotonische glucose-oplossing) is gebracht, wordt 10 minuten geschud, dan gecentrifugeerd en na twee uur het glucosegehalte der bovenstaande vloeistof bepaald. Zij vonden hierbij constant minder glucose in deze vloeistof, wanneer insuline was toegevoegd dan wanneer dit niet het geval was geweest. HÄUSLER en LOEWI besluiten hieruit, dat insuline de binding

⁶⁴⁾ VELICOGNA, Arch. di Fisiol. 25, 1927 (cit. Zentral Bl. 49, 1928).

⁶⁵⁾ ELISABETH MÜLLER, Bioch. Ztschr. 175, 1926.

⁶⁶⁾ HÄUSLER en LOEWI, Pflügers Arch. f. die ges. Physiol. 210, 1925.

van glucose aan weefsel bevordert. Of het hierbij noodzakelijk is, om zooals zij doen, verschil te maken tusschen glucose-binding en glucose-permeabiliteit, schijnt mij, evenals WIECHMANN⁶⁷⁾, aan twijfel onderhevig. Zij doen dit uitsluitend op grond van het feit, dat zij glucose aan de weefsels gebonden vinden, ook wanneer de celstructuur vernietigd is en dus van een binnendringen in de cel geen sprake meer kan zijn. Dit argument vervalt echter, wanneer men met TRAUBE de permeabiliteit wil opvatten als een verschijnsel waarvan het essentieele zich afspeelt overal daar waar grensvlakken aanwezig zijn. Volgens deze theorie is dan het binnendringen in een cel slechts een secundair gevolg van veranderingen aan het celoppervlak⁶⁸⁾,⁶⁹⁾.

Overigens kunnen ook tegen de methode zelf m.i. wel eenige bezwaren worden geopperd. In de eerste plaats wordt bloed onstolbaar gemaakt met NaFl; waarbij niet vast staat, dat ook het eerste begin van stolling wordt voorkomen; iets dat voor de verdeeling van glucose tusschen plasma en erythrocyten niet zonder beteekenis is. Verder kregen zij slechts de beschreven resultaten, wanneer zij insuline hoeveelheden gebruikten, die liggen ver boven de ooit in vivo gebruikte dosis. Zij schrijven dit ten deele hieraan toe, dat zij in een zoo onphysiologisch milieu werkten; bovendien zouden er in het lichaam nog onbekende factoren kunnen zijn, die de werking van het insuline verhoogden. Wanneer men echter ziet, dat om de werking van insuline aan te toonen, concentraties noodig zijn,

67) WIECHMANN, Münch. Med. Woch. Schr. 74, 1927.

68) ZONDEK, „Die Elektrolyte” Springer 1927.

69) GELLHORN, „Das Permeabilitätsproblem” Springer 1928.

die overeenkomen met een injectie van 5000 Eenheden bij den mensch, dan rijst toch wel de vraag, of men uit het effect van een dergelijke, enorme dosis wel conclusies mag trekken over de physiologische werking van een stof. En des te meer geldt deze redeneering, waar men zooals hier, te doen heeft met een product van interne secretie, terwijl toch juist van de hormonen een werkzaamheid in minimale concentratie opvallend is.

Kan men dus tegen de proefopstelling zelf, die LOEWI en zijn medewerkers gebruikten, reeds eenige bezwaren opperen, zij, die werkten met de door hem aangegeven methode, kwamen niet steeds tot overeenstemmende of constante resultaten ^{70, 71, 72, 73}). Tenslotte heeft LOEWI ⁷⁴) zelf zijn theorie moeten herroepen, daar ook hij de experimenten, waarop zijn opvattingen berusten, niet meer kon herhalen. De oorzaak hiervan heeft hij niet kunnen aantonen, maar toch meent hij bij zijn oude proefopstelling te moeten blijven. Daar van andere zijde hierop voor zoover mij bekend alleen kritiek is uitgeoefend door HÖGLER, THOMAS en ÜBERRACK ⁷⁵), welke kritiek door HÄUSLER en LOEWI ⁷⁶) volkomen verworpen wordt, heb ik toch gemeend niettegenstaande LOEWI's herroeping, de hierboven ontwikkelde principiele bezwaren tegen zijn methode te mogen uiteenzetten. HÖGLER, THOMAS en ÜBERRACK hebben een groot aantal proeven volgens LOEWI verricht en kwamen daarbij

⁷⁰) HARPUDER, *Klin. Woch. Schr.* 7, 1928.

⁷¹) EISNER en LEWY, *Bioch. Ztschr.* 202, 1928.

⁷²) FONTES en THIVOLLE C. R. Soc. de Biol. 98, 1928.

⁷³) SALÉN en NYRÉN, *Acta Med. Scand.* 69, 1928.

⁷⁴) DIETRICH en LOEWI, *Klin. Woch. Schr.* 7, 1928, 8, 1929.

⁷⁵) HÖGLER, THOMAS en ÜBERRACK, *Bioch. Ztschr.* 209, 1929.

⁷⁶) HÄUSLER en LOEWI, *Bioch. Ztschr.* 214, 1929.

tot zeer inconstante resultaten. Bij het zoeken naar de oorzaak daarvan, kwamen zij op de gedachte, dat zwelling der erythrocyten in de verschillende door LOEWI gebruikte media, een bron van fouten zou kunnen vormen voor de juiste beoordeeling der glucose-opname. Zij nemen n.l. op grond van hun proeven aan, dat gezwellen roode bloedlichaampjes meer glucose opnemen, dan wanneer daarin geen zwelling is opgetreden. Maar ook, wanneer de erythrocyten gesuspenderd worden in een oplossing met welker invloed op de zwelling nauwkeurig rekening wordt gehouden, blijken toch nog met de methode inconstante resultaten te worden bereikt. Maar in elk geval vinden de schrijvers de door de zwelling der erythrocyten veroorzaakte fouten zoo belangrijk, dat daardoor de verschillen, die LOEWI aan een vermeerderde of verminderde glucose-fixatie toeschrijft, huns inziens tenminste ten deele kunnen worden verklaard.

Ook met doorstroomingsproeven van overlevende organen heeft men getracht een invloed van insuline op de glucosepermeabiliteit aan te toonen. Een aanwijzing voor het bestaan van een dergelijken invloed ook in vitro, ligt in proeven van GEIGER en LOEWI ⁷⁷⁾, die vonden, dat in het serum van diabeteslyders stoffen voorkomen, die de opname van glucose in de levercellen remmen. Zij vermoeden op grond van deze uitkomst, dat ook in het levende diabetische organisme een verminderde permeabiliteit voor glucose bestaat. De gevonden resultaten laten echter ook een andere duiding toe. BISSINGER ⁷⁸⁾ toonde n.l. aan, dat zij niet

⁷⁷⁾ GEIGER en LOEWI, Pflüg. Arch. f. die ges. Physiol. 198, 1923.

⁷⁸⁾ BISSINGER, Bioch. Ztschr. 185, 1927.

moeten worden toegeschreven aan een verminderde glucose-opname, maar aan een verhoogd glucosegehalte der levercellen, waardoor minder glucose uit de buiten-vloeistof in de cellen diffundeert. BERNHARD ⁷⁹⁾ doorstroomde de overlevende kikkorschleper met een glucosehoudende vloeistof en zag dan, indien ook insuline was toegevoegd, inderdaad meer glucose uit de doorstrooingsvloeistof verdwijnen. Daar hij echter het glucosegehalte van de levercellen aan het begin en aan het einde van de proef gelijk vindt, meent hij een verandering van de permeabiliteit van de levercel niet te kunnen aannemen. HEPBURN en LATCHFORD ⁸⁰⁾ doorstroomden het konijnenhart met vloeistof van LOCKE en zagen daarbij een gemiddeld ruim driemaal sterkere glucose-opname, wanneer insuline was toegevoegd. Tot analoge resultaten kwamen BURN en DALE ⁸¹⁾, evenals MANSFELD en GEIGER ⁸²⁾. ASZODI ⁸³⁾ volgde een eenigszins andere werkwijze. Hij voegde niet zoals de genoemde auteurs, aan de doorstrooingsvloeistof insuline toe, maar gaf eerst insuline in vivo, en nam daarbij dan waar, dat de harten van pancreasdiabetische dieren, die anders minder glucose gebruiken dan normaal, weer een normaal glucose verbruik kregen. Dat dit met een permeabiliteitsvermeerdering samenhangt, is natuurlijk zeer wel mogelijk, maar door deze proeven niet aan te toonen.

Aan MANN en MAGATH ⁸⁴⁾ was het opgevallen, dat

⁷⁹⁾ BERNHARD, *Bioch. Ztschr.* 157, 1925.

⁸⁰⁾ HEPBURN en LATCHFORD, *Am. Journ. of Physiol.* 62, 1922.

⁸¹⁾ BURN en DALE, *Journ. of Physiol.* 59, 1924.

⁸²⁾ MANSFELD en GEIGER, *Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol.* 106, 1925.

⁸³⁾ ASZODI, *Bioch. Ztschr.* 192, 1928.

⁸⁴⁾ MANN en MAGATH, *Am. Journ. of Physiol.* 65, 1923.

de verschijnselen, veroorzaakt door een groote dosis insuline, dezelfde zijn als die welke teweeg gebracht worden door extirpatie van de lever. Zij stelden zich nu de vraag of de lever ook een belangrijke rol speelt bij het tot stand komen der insuline werking. Wanneer zij echter bij honden de lever wegnamen en door glucosetoevoer de ontstane symptomen in bedwang hielden, bleek echter toch even goed het insuline zijn hypoglycaemisch makende werking uit te oefenen. Het zou nu mogelijk zijn, dat onder invloed van insuline zoowel de lever als de spieren meer glucose opnemen en dat zoo de hypoglycaemie veroorzaakt wordt, en dat tegenover het groote glycogeen depôt in de spieren dat in de lever slechts een quantitatief ondergeschikte rol speelt. Indien dit het geval is, zal men als het meest waarschijnlijk moeten verwachten, dat na leverextirpatie minder snel een hypoglycaemie door insuline optreedt. Het tegendeel blijkt echter, n.l. dat het herstel na de hypoglycaemie bij deze dieren langzamer is dan normaal. Merkwaardigerwijze vinden dan later BOLLMAN, MANN en MAGATH,⁸⁵⁾ dat na wegname van het grootste deel of van de heele lever het glycogeengehalte der spieren is verminderd. Een synthese van het glycogeen vindt eerst dan weer plaats, indien door glucosetoevoer een aanzienlijke hyperglycaemie is opgewekt. Hierin ziet AMMON⁸⁶⁾ het bewijs, dat deze glucose dan door de membranen der spierfibrillen in de spieren moet zijn doorgedrongen, daar het glycogeen intracellulair ligt. De drie Amerikaansche auteurs onderzochten ook het effect van leverextirpatie bij pancreasdiabetische

⁸⁵⁾ BOLLMAN, MANN en MAGATH, *Am. Journ. of Physiol.* 74, 1925

⁸⁶⁾ AMMON, *Bioch. Ztschr.* 196, 1928.

honden en zagen ook dan een snelle bloedsuikerdaling optreden, zelfs nog sneller dan bij normale dieren. Hieruit volgt dus, dat in dit geval de permeabiliteit der weefsels voor glucose niet kan zijn opgeheven (E. J. LESSER). Dit is dus in tegenstelling met de waarnemingen van HÄUSLER en LOEWI, die zagen dat roode bloedlichaampjes van den mensch minder glucose opnemen uit het plasma van pancreaslooze, dan van normale honden, waaruit zij dus besluiten, dat na pancreas extirpatie in het plasma stoffen voorkomen, die de permeabiliteit voor glucose verminderen.

De eerste directe proeven, die zijn gedaan om den eventueelen invloed van insuline op de weefselpermeabiliteit aan te toonen, stammen van AMMON (l.c. 86). Hij onderzocht de diffusiesnelheid van glucose door verschillende overlevende membranen. Gebruikt werd daartoe een apparatuur, vervaardigd in navolging van een door A. KROGH toegepaste methode om de diffusie constante van O_2 in spierweefsel te bepalen. Dit apparaat is in principe een dialyseertoestel, waarbij dus de te onderzoeken membraan gespannen wordt op een vat, dat bij deze proeven gevuld was met een Ringer-oplossing die 0,2—1,5 % glucose bevatte. Hieraan werd dan nog toegevoegd 0,5—1 Eenheid insuline per 100 cc. Het geheel werd dan gedompeld in een zuivere Ringer-oplossing en de diffusie van glucose van de binnen- naar de buitenvloeistof onderzocht.

Als membranen gebruikte AMMON de zijde musculatuur van caviae, muizen en kikvorschen. Verder ook het centrum tendineum van caviae en hun mesenterium. In sommige experimenten werd niet achteraf insuline toegevoegd, maar werden membranen gebruikt van insuline-dieren, dat zijn dan dieren, die vooraf een

sterke koolhydraatvoeding hebben gehad en waarvan de insuline secretie als maximaal mag worden beschouwd. Hij vindt nu, dat in een aantal van deze gevallen, wanneer dus insuline tegenwoordig is, minder glucose door de membraan gaat, dan wanneer het insuline niet aanwezig is. Het is mogelijk, dat dit toe te schrijven is aan een permeabiliteitsverandering der membranen, die dan dus in dit geval een vermindering zou moeten zijn. Zijn uitkomsten zijn echter zoo wisselend, dat een bepaalde conclusie hierover, ook naar zijn eigen meening, daaruit niet te trekken is. De mogelijkheid, dat zijn resultaten zouden zijn te verklaren door adsorptie aan de spiermembraan, meent hij te kunnen uitsluiten op grond van vergelijkende glucosebepalingen in de membranen, welke wel en die, welke niet met insuline behandeld waren; zooals dat is uitgevoerd door CUENCA (l. c. 55). Met membranen van pancreas-diabetische dieren komt hij niet tot andere resultaten, dan wanneer die van normale gebruikt werden. Ook hierin is dus evenmin als in de proeven van BOLLMAN, MANN en MAGATH (l. c. 85) een aanwijzing te vinden, dat bij pancreas-diabetes de permeabiliteit voor glucose verminderd zou zijn. AMMON meent zijn resultaten het meest plausibel te kunnen verklaren door aan te nemen, dat de insuline de glucose-oxydatie aan de spiermembraan bevordert en daardoor het concentratieverschil aan weerszijden daarvan verkleint, waarvan een verminderde diffusie het gevolg is.

Meer in het algemeen onderzochten in den laatsten tijd E. en H. GELLHORN ⁸⁷⁾ den invloed van interne secretie producten op de permeabiliteit. Zij gebruikten

⁸⁷⁾ E. en H. GELLHORN, *Pflügers Arch.* 221, 1928.

daartoe kikvorschhuid, met den buiten- of den binnenkant naar buiten gekeerd, dus „normal” of „gewend” volgens WERTHEIMER ⁸⁸⁾, en spiermembraan volgens WINTERSTEIN ⁸⁹⁾. Van de hormonen gingen zij den invloed na van adrenaline, thyroxine en insuline. Het bleek hun, dat alle drie genoemde producten een invloed op de permeabiliteit uitoefenen. De werking is echter afhankelijk van de concentratie der toegevoegde hormonen. Voor het adrenaline werd zelfs een remmende en een verhoogende invloed op de permeabiliteit vastgesteld. Bij adrenaline-concentraties van 1 : 1000 000 had de laatste, bij geringere concentraties als 1 : 5000 000 en minder de eerste werking de overhand. Thyroxine, zowel als insuline bleken een verhoogenden invloed te hebben. Deze was voor insuline duidelijk bij concentraties van 1 Eenheid per 100 cc. Werd 0,5 Eenheid per 100 cc. gebruikt, dan waren de resultaten wisselend; terwijl bij nog geringer hoeveelheden, als 0,2 Eenheid per 100 cc. een waarneembare invloed ontbrak. Uit deze mooie proeven blijkt dus in de eerste plaats, dat duidelijke verschillen zijn aan te toonen bij hormoon concentraties, zooals ook in het levende organisme kunnen voorkomen. Één ding echter in GELLHORN's experimenten geeft m.i. aanleiding tot gerechtvaardigde kritiek en wel, dat zij niet werken met een physiologische glucose concentratie, maar met oplossingen van 2,50—3,15 ‰. Dit maakt het overbrengen van in vitro verkregen waarden en daarop gebaseerde opvattingen over het mechanisme in vivo, nog onzekerder dan het reeds is.

Het is opvallend, dat de insuline-concentraties, die

⁸⁸⁾ WERTHEIMER, Pflügers Arch. 199, 1923.

⁸⁹⁾ WINTERSTEIN, Bioch. Ztschr. 75, 1916.

AMMON bij zijn boven vermelde proeven gebruikte, ten deele dezelfde zijn, waarmede ook GELLHORN sterk wisselende uitkomsten kreeg. Waar bovendien AMMON vaak andere membranen gebruikte, ligt misschien hierin de verklaring van zijn inconstante resultaten.

Behalve increten onderzocht GELLHORN ook nog eenige vegetatieve giften op hun invloed op de permeabiliteit. Het is hierbij van belang vast te stellen, dat, waar insuline een verhooging geeft, het atropine in hoeveelheden van 1 : 10000 tot 1 : 30000 juist een vermindering geeft.

Van de organen, waarvan het van belang is de permeabiliteit voor glucose na te gaan, moeten wel in de eerste plaats de nieren worden genoemd. En zoo zijn dan ook sinds in 1877 CLAUDE BERNARD de hypothese opstelde, dat er verband zou bestaan tusschen hyperglycaemie en glycosurie, vele onderzoekingen verricht om te trachten hiervoor quantitatieve regels te vinden. Dit heeft echter niet geleid tot het gewenschte resultaat. En zoo is men dan ook gekomen tot de opvatting, dat bij diabetes nog andere factoren dan de drempelwaarde der nieren voor glucose een rol spelen, of dat in het lichaam van den diabeteslijder stoffen voorkomen of ontbreken, waardoor het doorlatingsvermogen der nieren voor glucose gewijzigd wordt. In het bijzonder is dan hierbij gedacht aan den invloed van pancreas-extracten. Het eerst is dit nagegaan door DE MEIJER ⁹⁰⁾. Later zijn dergelijke onderzoekingen verricht door v. CREVELD en v. DAM ⁹¹⁾ bij overlevende kikkervorsnieren. Zij gingen uit van een doorstroomingsvloei

⁹⁰⁾ DE MEYER, Arch. Int. de Physiol. 7, 8, 1909.

⁹¹⁾ v. CREVELD en v. DAM, N. T. v. G. 67, 1923.

aangegeven door HAMBURGER en BRINKMAN ⁹²⁾, waarmee bij een glucosegehalte van 0.08 % deze door de nieren quantitatief werd tegengehouden. Werd echter dit gehalte verhoogd, dan werd glucose doorgelaten. Het bleek nu aan v. CREVELD en v. DAM, dat, indien aan de doorstroomingsvloeistof een eigengemaakt — volgens de voorschriften der Toronto'er onderzoekers bereid — pancreas extract werd toegevoegd, de nier minder permeabel werd voor glucose of misschien beter gezegd, de nierfunctie zoodanig werd gewijzigd, dat minder glucose wordt doorgelaten.

Daarvoor spreken ook in vivo verrichte proeven met insuline van MAURIAC en AUBERTIN ⁹³⁾. Zij vergeleken het glucose-gehalte in het bloed van de aorta abdominalis met dat der vena renalis en vonden na insuline-injectie een geringer verschil tusschen beide, dan voordien. Uit den laatsten tijd dateeren over dit onderwerp nog waarnemingen van ELIAS en GÜDEMANN ⁹⁴⁾. Zij vonden, dat de bloedsuikerwaarde, waarbij glycosurie optreedt, voor en na insuline-injectie zoowel bij normale menschen als bij diabetes-patienten dezelfde is. De drempelwaarde der nieren voor glucose is dus daardoor niet veranderd.

Samenvattend zien wij dus, dat vele argumenten vooral bij het onderzoek in vivo er voor spreken, dat onder invloed van insuline meer glucose in de weefsels wordt opgenomen. De meeste in vitro uitgevoerde proeven geven wel een vermeerdering van het glucose-

⁹²⁾ HAMBURGER en BRINKMAN, *Bioch. Ztschr.* 88, 1918.

⁹³⁾ MAURIAC en AUBERTIN, *Cpts. Rend. des séances de la soc. de Biol.* 91, 1924.

⁹⁴⁾ ELIAS en GÜDEMANN, *Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol.* 119, 1927.

verbruik te zien bij aanwezigheid van insuline. Maar in hoeverre hierbij permeabiliteitsveranderingen een rol spelen, is evenmin als voor de bij het levende individu gedane proeven duidelijk aangetoond. De, voor zoover mij bekend, eenige experimenten, die zich direct met het permeabiliteitsvraagstuk bezig houden, zijn die van AMMON en die van GELLHORN, waarbij dan de eerste geen constante verandering van de permeabiliteit vindt, terwijl de laatste bij bepaalde insulineconcentraties steeds een vermeerdering ziet optreden.

HOOFDSTUK III.

EIGEN EXPERIMENTEN.

Om na te gaan of ter verklaring van de insuline-werking, een permeabiliteitsverandering moet worden aangenomen, heb ik getracht op verschillende manieren, onder zoo eenvoudig mogelijke omstandigheden, een dergelijken invloed aan te toonen. Daartoe heb ik een aantal proeven verricht in vitro, daar het mij voor het verkrijgen van een oordeel in deze vraag noodzakelijk voorkwam, zooveel mogelijk alle factoren, die een duiding der uitkomsten op andere gronden dan een permeabiliteitsverandering toelaten, te kunnen uitschakelen. En in het bijzonder in een zoo gecompliceerd proces, als de koolhydraatstofwisseling en den invloed van interne secretie-producten daarop, komt mij een dergelijke vereenvoudiging van de proefomstandigheden zeer gewenscht voor. Een positief resultaat zou het dan zeer waarschijnlijk maken, dat de permeabiliteit der weefsels ook voor de insuline-werking in vivo een rol speelt. Het spreekt echter vanzelf dat een negatieve uitkomst, niet het recht geeft tot de omgekeerde conclusie. Wel echter wordt in het laatste geval het bestaan van een directe invloed op het doorlatingsvermogen der weefsels door insuline onwaarschijnlijk gemaakt.

Gebruikt werden de volgende methoden:

1. Volume bepalingen van roode bloedlichaampjes.
2. Bepaling van de plasmasuiker, indien er al of niet insuline aan het bloed is toegevoegd.
3. Onderzoek naar de doorgankelijkheid van spier-peritoneum-membranen van kikvorschen voor glucose.
4. Onderzoek naar de doorgankelijkheid van amnion-vlies voor glucose.

Sub. 1.

Wanneer bloedlichaampjes worden gebracht in een zoutoplossing, waaraan glucose is toegevoegd, dan zal men, indien deze glucose doordringt in de cellen, moeten verwachten, dat hun volume toeneemt, iets wat dus in een haematokriet volgens KOEPPE kan worden bepaald. Ik gebruikte de door HAMBURGER aangegeven modificatie daarvan, de chonohaematokriet. De volume-bepalingen worden als volgt uitgevoerd:

De haematokrieten werden gevuld met resp.

Ringeroplossing

Ringeroplossing + 0,1 % glucose

Ringeroplossing + insuline

Ringeroplossing + glucose + insuline.

De Ringeroplossing had de volgende samenstelling:

NaCl 0.5 % NaHCO_3 0.25 % CaCl_2 . 6 aq. . 0.04 %,
KCl 0.02 %.

De hoeveelheid insuline was 0.4 Eenheid per 100 cc. Gebruikt werd insuline „Leo”. Het bloed werd genomen uit den vingertop en 0.04 cc. gebracht in de haematokriet. De uitkomsten van deze proeven zijn in tabel I weergegeven. De getallen in de 4 laatste kolommen,

geven aan de hoogte van het bloedlichaampjes-zuiltje in de gec calibreerde capillair van de haematokriet, nadat zoolang gecentrifugeerd is, dat deze hoogte niet meer verandert d.i. gedurende minstens 2 uren. Hierin heeft men dan dus een maat voor het volume der erythrocyten. De getallen zijn evenals die in de volgende tabellen het gemiddelde van telkens twee bepalingen.

TABEL I.

Volumina der roode bloedlichaampjes.

No.	Ringer	Ringer + insuline	Ringer + glucose	Ringer + glucose + insuline
1	24	28	25	27
2	29	26		24
3	30	30	28	
4	28	31	29	31
5	29	28	27	28
6	27	26		27
7	28	27	30	30
8		28	28	28

Wij zien hier dus, dat in het meerendeel der proeven geen verschil bestaat tusschen het volume in een oplossing van Ringer + glucose + insuline en dat in een zuivere Ringervloeistof. Wel is in de proeven No.'s 1, 4 en 7 het volume in de laatste kolom grooter dan in de eerste. Men ziet echter dat in no.'s 1 en 4 de waarden in de tweede en vierde kolom, d.i. dus in Ringer +

insuline en Ringer + glucose + insuline, overeenstemmen. In no. 7 is iets dergelijks het geval. Daar vindt men gelijke volumina zoowel in Ringer + glucose, als in Ringer + glucose + insuline. Aan een vermeerderde permeabiliteit der erythrocyten voor glucose onder invloed van insuline kan dit dus niet zijn toe te schrijven.

Het zou nu echter nog mogelijk zijn, dat eerst de glucose wordt geadsorbeerd aan het celoppervlak en slechts langzamerhand in de cel binnendringt, zooals EGE ⁹⁵⁾ op grond van de incongruentie tusschen osmotische verschijnselen en langs chemischen weg bepaalde glucoseopname in de bloedlichaampjes aanneemt. Deze proeven zijn gedaan in een isotonische glucose-oplossing. Behalve de reeds genoemde verklaring voor de gevonden incongruentie, oppert EGE ook nog een andere mogelijkheid. Het is toch mogelijk, dat in de niet-electrolytoplossing die hij gebruikte, een diffusie van ionen uit de cel naar buiten plaats heeft, waarvan dus een vermindering van osmotischen druk het gevolg is, zoodanig, dat een door het binnengedrongen glucose veroorzaakte volumetoename, niet direct tot uiting komt.

Om het langzamerhand binnendringen van de glucose in de cellen als verklaring voor de in de vorige tabel gegeven uitkomsten te kunnen uitsluiten, deed ik nog enkele volume-bepalingen, waarbij de erythrocyten gedurende geruimen tijd met de Ringer-glucose-oplossing waren in aanraking geweest.

⁹⁵⁾ Ege Bioch. Ztschr. 114, 1921.

TABEL II.
Volumina der roode bloedlichaampjes.

		Ringer + glucose	Ringer + glucose + insuline
1	direct	10	10
	na 2 uur	10	10
2	direct	14	14
	na 19 uur	18	15

Zelfs na 19 uur, is nog niets van een volume-toename te bespeuren; iets, wat dus ook niet pleit voor de door LOEWI (l.c. 54) aangenomen fixatie aan het celoppervlak. Want indien deze inderdaad plaats had, zou toch ten slotte ook hier, evenals in de oorspronkelijke proeven van EGE, binnendringen in de cel en volume-vermeerdering hiervan, hebben plaats gehad.

Sub. 2.

Bepaling van de plasmasuiker.

Hiervoor werd bloed, verkregen door venapunctie, onmiddellijk opgevangen in geparaffineerde buisjes en door snel centrifugeeren plasma en bloedlichaampjes gescheiden zonder dat stolling optrad. In het eene buisje werd nu insuline toegevoegd, 0,07 Eenheid per cc. en het glucosegehalte van het plasma in beide buisjes bepaald volgens BANG. Indien dus glucose zou binnendringen in de bloedlichaampjes, of ook alleen maar worden geadsorbeerd aan hun oppervlak, dan zal men in het buisje, waaraan insuline was toegevoegd, het glucosegehalte in het plasma lager moeten vinden dan in het controlebuisje.

De resultaten van deze proeven zijn in de volgende tabel weergegeven.

TABEL III.

No.	plasmasuiker in mg $\frac{0}{0}$ zonder insuline	plasmasuiker in mg $\frac{0}{0}$ met insuline
1	0,114	0,131
2	0,104	0,115
3	0,111	0,129
4	0,095	0,104
5	0,100	0,137
6	0,126	0,134
7	0,156	0,154
8	0,122	0,154
9	0,137	0,183
10	0,102	0,124

Wij zien dus uit deze waarnemingen, dat niet alleen het glucosegehalte van het plasma na insulinetoevoer niet verlaagd is, maar dat merkwaardigerwijze het tegendeel heeft plaats gehad. Dus juist omgekeerd als men zou verwachten. Het glucosegehalte, of in elk geval de reduceerende factor in het plasma is grooter, wanneer insuline was gegeven. De gevonden verschillen zijn zoo constant aanwezig en bovendien ook weer het gemiddelde van dubbelbepalingen, dat men dit niet aan toevalligheden kan toeschrijven, maar hiervoor een zeer bepaalde oorzaak moet aannemen. Temeer wordt men hiertoe genoopt, daar het verschil tusschen

de getallen in beide kolommen, steeds ongeveer even groot is. Ter verklaring, denkt men natuurlijk in de eerste plaats aan de mogelijkheid, dat insuline zelf reductie geeft. Met het oog hierop, werden eenige proeven verricht, waarbij insuline in dezelfde concentratie als boven aangegeven voor het bloed, werd toegevoegd aan een Ringeroplossing. De reductie van deze Ringeroplossing met insuline werd dan vergeleken met die van een zuivere zoutoplossing.

TABEL IV.

aantal honderdste cc. verbruikte hoeveelheid $\frac{1}{100}$ N natriumthiosulfaat			
No.	Ringer	Ringer + insuline	Verskil in mg % glucose
1	1	0	— 0.005
2	2	3	+ 0.005
3	6	6	0
4	2	18	+ 0.057
5	1	6	+ 0.019
6	1	4	+ 0.012

Practisch blijkt dus de reductie met en zonder insuline gelijk te zijn. Alleen in de vierde proef, is duidelijk meer natriumthiosulfaat nodig geweest, om het door de Ringer met insuline vrijgemaakte jodium te neutraliseeren, dan voor de Ringer alleen nodig bleek te zijn. Het verschil is hier dus 0,16 cc. $\frac{1}{100}$ N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Dit komt overeen met een reductie van 0.057 mg % glucose. Door het teeken — in de 4e kolom is aangegeven dat de reductie van Ringer met insuline kleiner was dan die van Ringeroplossing alleen, door het teeken +

het omgekeerde. Het insuline zelf in een Ringeroplossing geeft dus geen of een zeer geringe reductie, die zeker niet voldoende is om de met de plasmasuikers verkregen uitkomsten te verklaren.

De tweede verklaringsmogelijkheid is nu, dat het insuline samen met het plasma sterke reductie geeft. Om dit na te gaan werd plasma, dat dus door afcentrifugeeren in een geparaffineerd buisje verkregen was, opgezogen in telkens twee bloedsuikerpapiermpjes van BANG. Op het eene papieretje werd dan bovendien een druppel insuline gebracht. Het blijkt dan, dat dit papieretje een zeer sterke reductie geeft, zelfs zoo sterk, dat de gebruikelijke hoeveelheid alkalische koperhoudende jodaatoplossing, die bij de bepaling volgens BANG moet worden toegevoegd, niet voldoende is, om zooveel Jodium af te geven als overeen komt met de aanwezige hoeveelheid reduceerende substantie. Er werd dus een twee maal grootere hoeveelheid jodaat toegevoegd, dan oorspronkelijk voor de bloedsuikerbepalingen is aangegeven en het vrij gekomen Jodium op de gewone wijze getitreerd. De uitkomsten van deze bepalingen zijn in de volgende tabel weergegeven.

TABEL V.

aantal honderdste cc. verbruikte hoeveelheid $\frac{1}{100}$ N. Natriumthiosulfaat		
No.	plasma	plasma + 1 gtt. insuline
1	33	216
2	30	216
3	50	214
4	38	132

Uit een vergelijking der cijfers in de tweede en de derde kolom, blijkt dus zeer duidelijk, dat de hoeveelheid natriumthiosulfaat, noodig om het door reductie vrijgekomen jodium te neutraliseeren veel grooter is, wanneer insuline was toegevoegd. De oorzaak van deze sterke reductie, is moeilijk uit te maken. Zij kan berusten, of op vrijkomen van een gebonden suiker, zooals het bestaan daarvan vooral van Fransche zijde (LEPINE e.a.) is aangenomen, dus een „sucre virtuel” of doordat het insuline met eenige andere stof in het plasma, een omzetting geeft, waardoor sterk reduceerende stoffen gevormd worden. Het onderzoek naar de vraag welke van deze beide mogelijkheden als de meest waarschijnlijke moet worden aangenomen, stuit op groote chemische moeilijkheden, en ligt ook buiten het bestek van dit proefschrift. Wel kan ik er nog op wijzen, dat ook na onteiwitten met trichloorazijnzuur, en daaropvolgende neutralisatie met natronloog, de onteiwitte fractie, na toevoeging van insuline nog een sterke vermeerdering van de reductie geeft. Terwijl ook na aanzuren met wijnsteen zuur en daaropvolgende vergisting, deze fractie, samen met insuline, het reduceerend vermogen nog op dezelfde wijze schijnt te bezitten. Ik hoop later nog op dit belangwekkend verschijnsel, zoowel als op de vraag of het zich quantitief zal laten uitwerken, nader te kunnen terugkomen.

Sub. 3.

Onderzoek naar de doorgankelijkheid van spiermembranen van de kikvorsch voor glucose.

Gebruikt werden membranen volgens WINTERSTEIN, dus spier-peritoneum-membranen. Steeds werden twee symmetrische gedeelten van den buikwand van, bij

voorkeur vrouwelijke, *Rana Esculenta* genomen. Deze membraantjes werden dan gespannen op een dialyseer apparaatje, met de peritoneumzijde naar binnen gericht. Het zoo gevormde bekertje werd dan gevuld met een Ringeroplossing, zooals is aangegeven door HAMBURGER (l.c. 92) en zijn medewerkers, en waarvan de samenstelling is NaCl 0.5 %, NaHCO_3 0.25 %, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{aq.}$ 0.04 %, KCl 0.02 %. Hieraan werd toegevoegd 0.1 % glucose, en het geheel gedompeld in een bekerglaasje, dat alleen met de zoutoplossing gevuld was. In een der beide binnenste bekertjes werd dan bovendien wat insuline gebrachten wel 0.01 Eenheid per cc. vloeistof. Na twee uur werd dan in de buitenvloeistof het glucosegehalte volgens de methode van BANG bepaald. Wanneer dus insuline de permeabiliteit dezer membraantjes voor glucose verhoogt, zal men in deze buitenvloeistof sterker reductie moeten vinden.

TABEL VI. Kikvorschmembranen.

No.	zonder insuline	met insuline	verschil	Blanco
1	190	189	+ 1	197
2	180	168	+ 12	198
3	181	188	— 7	198
4	188	150	+ 38	198
5	195	194	+ 1	197
6	190	185	+ 5	198
7	184	182	+ 2	198
8	180	187	— 7	198
9	187	192	— 5	197
10	179	185	— 6	197

In de vijfde kolom is aangegeven de Blanco, waaronder men hier dus heeft te verstaan, de reductie, veroorzaakt door het extractiepapiertje zelf en door de uittrekvloeistof, die moet worden toegevoegd. Het verschil tusschen de blanco en de in de tweede en derde kolom gegeven cijfers geeft dus aan de reductie door de buitenvloeistof. In de 4e kolom vindt men het verschil tusschen de cijfers in de 2e en 3e kolom, d.i. dus het verschil in reductie van de buitenvloeistof, wanneer al of niet insuline is toegevoegd. Door het teeken + is aangegeven, wanneer de reductie met insuline grooter was dan zonder insuline, door het teeken — het omgekeerde. De cijfers stellen voor het aantal honderdste cc. verbruikte hoeveelheid $n/100$ natriumthiosulfaat, dat noodig is om het door reductie vrijgemaakte jodium te titreeren.

De bepalingen geschiedden meestal nadat de proef ongeveer twee uur had geduurd. Uit de bovenstaande tabel blijkt dus, dat het reductie-verschil klein is, en bovendien niet steeds in dezelfde richting verloopt. Op grond van deze uitkomsten, meen ik dan ook voor deze proeven een permeabiliteits verandering door het insuline, niet te mogen aannemen.

Sub. 4.

Tenslotte deed ik ook nog proeven met membranen van warmbloedigen. Hiervoor werden gebruikt, amnion-vliezen van den mensch, die direct post partum werden schoongespoeld in een oplossing van Tyrode. De samenstelling hiervan is 0.8 % NaCl, 0.03 % KCl, 0.02 % CaCl_2 , 0.01 % MgCl_2 , 0.005 % NaH_2PO_4 , 0.05 % NaHCO_3 . De membraantjes worden dan hierin bewaard in de broedstoof bij 37°, tot zij, gemiddeld 4 uur post

partum, werden gebruikt. Dan werden twee dicht bij elkaar gelegen stukken uit het amnionvlies geknipt en beide met denzelfden kant naar binnen op het dialyseer apparaatje gespannen, zooals boven voor de kikvorsch-membranen is beschreven. Aan de binnenvloeistof werd dan 0,1 % glucose toegevoegd, en in een der beide binnenste bekertjes weer 0.01 Eenheid insuline per cc. gebracht. De proefopstelling was gelijk aan die, welke voor de membranen van koudbloedigen gebruikt is. Het eenigste verschil was, dat de vloeistoffen eerst op 37° werden verwarmd en ook gedurende den tijd, welke de proef duurde, alles in de broedstoof bij 37° werd geplaatst. De uitkomsten van deze waarnemingen zijn in de volgende tabel, die is samengesteld op dezelfde wijze als tabel VI samengevat.

TABEL VII.
Amnionvlies.

	zonder insuline	met insuline	verschil	Blanco
1	183	185	— 2	197
2	163	161	+ 2	194
3	169	171	— 2	194
4	175	182	— 7	195
5	162	165	— 3	195
6	167	168	— 1	196
7	172	169	+ 3	195

Ook hier zien wij dus de verschillen in reductie zoo gering, dat uit deze proeven eveneens blijkt, dat het insuline de permeabiliteit der membranen niet beïnvloedt.

Tenslotte wil ik naar aanleiding van deze, met overlevende membranen verrichte proeven, nog opmerken, dat ik, evenals AMMON (l.c. 86) waarnam, dat na lang staan wanneer de membranen gedood, of tenminste in veel slechtere conditie zijn hun permeabiliteit voor glucose sterk toeneemt.

Uit de negatieve resultaten van deze proeven in vitro, mag echter niet de conclusie worden getrokken dat ook in vivo de insulinerwerking niet met permeabiliteitsveranderingen samenhangt. Het is toch zeer wel mogelijk, dat insuline aanleiding geeft tot ionenverschuivingen, waarvan dan secundaire permeabiliteitsveranderingen het gevolg kunnen zijn. Voor de meening, dat insuline- en electrolytwerving inderdaad met elkander samenhangen, bestaan verschillende gronden⁹⁶⁾. De alkalose en het oedeem, dat na insuline-toediening soms optreedt, wijst in deze richting. Zelfs nog voor de ontdekking van het insuline sprak ARNOLDI⁹⁷⁾ de meening uit, dat aan de stoornis der koolhydraatstofwisseling een stoornis der mineraalhuishouding voorafgaat, waardoor het glucosetransport naar de weefsels bemoeilijkt wordt. BICKEL en KAUFMANN⁹⁸⁾ toonden aan, dat de insulinerwerking afhankelijk is van het mineraalgehalte van de voeding. Zij uiten de veronderstelling, dat de insulinerwerking, gebonden is aan een ionenwerking en aangrijpt aan het celoppervlak. ODA⁹⁹⁾ zag, dat KCl, in groote doses samen met insuline

96) ZONDEK, „Elektrolyte” p. 150 e.v. Springer, 1927.

97) ARNOLDI, Ztschr. f. Klin. Med. 92, 1921.

98) BICKEL en KAUFMANN, Münch. Med. Woch. Schr. p. 976, 1925.

99) ODA, Fol. endocrinol. japon. 3, 1927, (cit. Zentralbl. f. Inn. Med. 49, 1928).

intraveneus gegeven, den invloed van het insuline versterkt, terwijl CaCl_2 haar verzwakt. In denzelfden zin, hoewel zwakker dan het CaCl_2 , werkt het MgCl_2 . MASAMUNE¹⁰⁰⁾ onderzocht den invloed van verschillende zouten op het bloedsuikergehalte. Hij vond hierbij o.a. dat het ammoniumion een hyperglycaemie veroorzaakt, ook wanneer de alkalireserve van het bloed niet verminderd wordt.

¹⁰⁰⁾ Masamune, Fukuoka Ikwadaigaku Zasshi 20, 1927 (cit. Zentralbl. f. Inn. Med. 51, 1928).

HOOFDSTUK IV.

SAMENVATTING.

In het voorgaande overzicht van de litteratuur, hebben wij gezien, dat vooral vele proeven in vivo, erop wijzen, dat bij diabetes, zoowel van den mensch als bij door pancreasextirpatie diabetisch gemaakte proefdieren minder glucose in de weefsels voorkomt en eveneens minder glucose daarin wordt opgenomen, dan normaal het geval is. Het is echter buitengewoon lastig, uit deze feiten te concludeeren, tot de afwijking, die dit verminderde glucosegehalte veroorzaakt. Door een aantal schrijvers is hiervoor een permeabiliteits vermindering voor glucose aangenomen, die dan door het insuline weer wordt verhoogd. Deze permeabiliteitsvermindering zou dan een belangrijke rol spelen in de verklaring van de stoornis der koolhydraatstofwisseling bij diabetes.

Om tot een dergelijke opvatting te komen, moeten echter andere factoren, zooals vermeerderde glyco-geenvorming, versterkte verbranding der glucose en andere, eventueel nog onbekende invloeden, die de oorzaak zouden kunnen zijn van de na insulinetoediening waargenomen verhoogde weefselopname der glucose, worden uitgesloten. Dit is echter onder de

gecompliceerde omstandigheden van het experiment in vivo niet goed mogelijk. Wil men nagaan of het insuline inderdaad direct de weefselpermeabiliteit beïnvloedt, dan is het dus gewenscht, dit te doen in vitro. Hiervoor heb ik verschillende proeven verricht:

1.

Erythrocyten van den mensch, gesuspenderd in een Ringer-oplossing, waaraan 0,1 % glucose was toegevoegd, vertoonden onder invloed van insuline geen volumevermeerdering, wat er dus op wijst, dat geen glucose in de roode bloedlichaampjes is binnengedrongen.

2.

Wanneer menschenbloed wordt opgevangen in een geparaffineerd buisje en direct door centrifugeeren plasma en bloedlichaampjes worden gescheiden, dan moet men verwachten dat, indien inderdaad insuline de permeabiliteit der erythrocyten voor glucose verhoogt, na insuline toevoeging, minder glucose in het plasma wordt gevonden. Dit blijkt niet het geval te zijn; integendeel, vindt men in het plasma van het bloed, dat met insuline is gemengd, steeds een sterker reductie dan zonder insuline het geval is.

Het reduceerend vermogen van plasma wordt na insuline toevoeging, aanzienlijk verhoogd.

3.

Van een spier-peritoneum membraan van een kikvorsch, werd de doorgankelijkheid voor glucose bepaald. Aan weerszijden van dit membraantje, bevinden zich resp. een glucosevrije en een glucosehoudende Ringer-vloeistof. Indien aan de laatste bovendien nog insuline wordt toegevoegd, dan is geen sterker of sneller toe-

name van de reductie in de oorspronkelijk glucosevrije Ringer-oplossing aan te toonen, dan wanneer geen insuline is toegevoegd.

4.

Tot eenzelfde resultaat als deze proeven, voerden eveneens op analoge wijze uitgevoerde experimenten, waarbij als membraan verse menselijke amnion-vliezen werden gebruikt.

Al hebben nu deze proeven naar ik meen aangetoond, dat insuline in vitro de permeabiliteit niet beïnvloedt, dan mag men hieruit toch niet de conclusie trekken, dat dit in vivo evenmin het geval is. De uitkomst van de proeven in vitro maakt echter zeer onwaarschijnlijk, dat een eventueele invloed van insuline op de permeabiliteit, een directe kan zijn. Men zou dan moeten denken aan een tussenkomst van- of samenwerking met, stoffen of factoren, die in het experiment in vitro niet aanwezig zijn. In dit verband lijkt dan een verschuiving van ionen evenwichten met secundair daaraan verbonden permeabiliteitsveranderingen het meest waarschijnlijk. Temeer daar ook gegevens in de literatuur wijzen op het bestaan van een samenhang tussen insuline- en electrolytwerking.
